

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.001

· 基础研究 ·

蛋白聚糖在维持牙本质胶原空间形貌和水合性能方面的作用 *

高宇¹ 赵三军¹ 王培欢² 芦帅¹ 李晓静¹ 陈吉华^{1△}

(1 第四军医大学口腔医院修复科, 军事口腔医学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

2 济南军区总医院口腔科 山东 济南 250031)

摘要 目的:评价牙本质蛋白聚糖对脱矿牙本质胶原纤维形貌和水合性能的影响。**方法:**新鲜拔除无龋坏人磨牙牙本质酸蚀后分别用胰蛋白酶和硫酸软骨素酶 ABC 孵育去除牙本质蛋白聚糖和糖胺聚糖侧链, 对照组与实验组处理方法相同, 但孵育液中不添加酶。然后在牙本质表面不同润湿状态下用场发射扫描电镜和激光共聚焦扫描电镜分别观察牙本质的微观形貌并评价脱矿牙本质的水合性能。**结果:**硫酸软骨素酶 ABC 和 TRY 酶处理改变了牙本质的微观形貌, 使胶原纤维间距增大。酶处理、牙本质表面润湿性及两者的交互作用均会显著影响脱矿牙本质的厚度($P<0.0001$)。**结论:**牙本质蛋白聚糖和糖胺聚糖侧链在维持牙本质胶原纤维网的空间结构和水合作用方面均发挥着重要作用。蛋白聚糖、胶原纤维-蛋白聚糖以及蛋白聚糖-蛋白聚糖间的亲水性是影响脱矿牙本质围观形貌和厚度的重要因素。

关键词:胶原纤维; 牙本质; 糖胺聚糖侧链; 蛋白聚糖

中图分类号:R783.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4001-04

Effect of Proteoglycans on the Maintain Collagen Morphology and Hydration Status of Human Dentin*

GAO Yu¹, ZHAO San-jun¹, WANG Pei-huan², LU Shuai¹, LI Xiao-jing¹, CHEN Ji-hua^{1△}

(State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Stomatology, The General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong, 250031, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of proteoglycans on the maintain collagen morphology and hydration status of human dentin. **Methods:** Caries-free, human third molar dentin was acid-etched and treated with trypsin or chondroitinase ABC to remove the proteoglycans and attached glycosaminoglycans. Controls were prepared in the same manner but without using the enzymes. After digestion, FESEM and CLSM were used to evaluate the collagen morphology and hydration effects of dentin, respectively. **Results:** Digestion with trypsin or chondroitinase ABC induced enlarged interfibrillar spaces of acid-etched dentin and altered the collagen morphology. The factor enzyme treatment ($P<0.0001$) and the factor surface wetness status ($P<0.0001$) both significantly affected the thickness of acid-etching dentin. There was also significant difference for the factor interactions ($P<0.0001$). **Conclusion:** Glycosaminoglycans chains and proteoglycans were important in maintaining the spatial structure and hydration status of collagen fibril scaffold. The hydrophilic nature of proteoglycans and the collagen- proteoglycans and proteoglycans- proteoglycans networks affected the morphology and thickness of acid-etched dentin.

Key words: Collagen; Dentin; Glycosaminoglycans; Proteoglycans

Chinese Library Classification(CLC): R783.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)21-4001-04

前言

蛋白聚糖(PGs)在自然界中几乎无处不在, 从脊椎动物体内到非脊椎动物体内, 从矿化组织到非矿化组织, 均有大量蛋白聚糖存在^[1]。近年来, 对牙本质基质非胶原蛋白的研究越来越多^[2,3], 特别是牙本质蛋白聚糖(Dentin PGs)受到学者的广泛关注。牙本质中 90% 的有机基质为 I 型胶原纤维, 其余 10% 为牙本质非胶原蛋白, 其中大多为 PGs^[4]。PGs 由三维螺旋形的核心

蛋白(core protein)和以共价键连接在其上的亲水性的糖胺聚糖侧链(GAG side-chains)组成^[5]。

在牙本质中, 核心蛋白的螺旋结构由氢键、疏水作用和静电斥力作用稳定在一起^[6], 并通过大量氢键与附近的胶原纤维相连组成复杂的空间网状结构^[7]; GAG 为带负电荷的碳水化合物, 其种类主要为硫酸软骨素 4(C4S)和硫酸软骨素 6(C6S)^[8]。前期的研究证实, PGs 在牙本质矿化方面发挥着重要作用^[9], 并通过调节原纤维的生成控制牙本质的发生和发展^[10-12]。同时,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81130078; 81170985)

作者简介: 高宇(1986-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 口腔粘接技术; 电话: 029-84776128, E-mail: gaoyu851224@yeah.net

△通讯作者: 陈吉华, 电话: 029-84776329, E-mail: jhchen@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2014-02-27 接受日期: 2014-03-21)

PGs 也是决定细胞外基质机械性质的重要因素^[13]。在成熟牙本质中,PGs 与胶原纤维组成的超分子网状结构可以保证加载在牙本质上的功能性压力和拉力均匀分布^[14]。Goldberg M 的实验也通过 PGs 缺陷小鼠的研究证实 PGs 确实起到了调节胶原纤维直径的作用^[4]。

通过分析 PGs 的结构及其与牙本质中其他基质成分的相互作用可以推断 PGs 在维持牙本质空间结构和水合性能方面可能也发挥着重要作用,对上述两者的研究不仅能更深入的了解蛋白聚糖的功能,同时也可以为研究粘接基质在牙本质中的渗入和解决粘接耐久性这一普遍难题提供一定的理论依据。但到目前为止,尚未发现有此类的报道。因此,本实验拟利用场发射扫描电镜和激光共聚焦扫描电镜观察分析,研究酶孵育法分别去除牙本质 PGs 和 GAG 侧链前后牙本质空间结构及其水合性能的变化,为深入研究 PGs 在牙本质粘接耐久性中的作用机制提供一定的理论依据。

1 材料和方法

新鲜拔除的无龋坏人磨牙,刮除根部残存软组织,超声振荡清洁,贮存于 4℃ 的蒸馏水中备用。

1.1 牙本质胶原纤维的形态学分析

新鲜拔除的无龋坏人磨牙在流水降温下用慢速切割机(SYJ-150A,沈阳科晶公司,中国)磨除冠部牙釉质至釉牙本质界下,体式显微镜观察显露浅层牙本质,并进一步分割为 10×10×10 mm³ 的牙本质块。将浅层牙本质面作为观察面,流水冲洗下,水砂纸打磨至 1200 目,超声清洗,37%磷酸凝胶(ET290137,Vericom Co.,Korea)酸蚀 15 s,流水冲洗 15 s。然后将牙本质块随机分成 3 组,分别为硫酸软骨素酶处理组(C-ABC group)、胰蛋白酶处理组(TRY group)和对照组(control group)。C-ABC 和 TRY 酶分别可去除牙本质中的 GAGs 和 PGs。各组分别按以下方法进行处理:(1)C-ABC group:样本浸泡在溶剂为 0.01 %胎牛血清(Sigma-Aldrich,St. Louis,MO,USA;pH 调整为 8.0)的 0.1 U/ml 的 C-ABC(C2905,Sigma-Aldrich,St. Louis,MO,USA)溶液中,37℃ 振荡孵育 48 h。(2)TRY group:样本浸泡在由 0.2 M NH₄HCO₃ 缓冲液配制的浓度为 1 mg/ml 的 TRY(T1426,Sigma-Aldrich,St. Louis,MO,USA)溶液中,37℃ 振荡孵育 48h。(3)control group:样本处理与前两组相同,但是浸泡液为不含酶的缓冲液。各组的浸泡液均 24 h 更换一次。

孵育 48 h 后,各组样本蒸馏水冲洗 2 min 以去除表面依附的酶解掉的 GAGs/PGs。每组再根据表面润湿度的不同分为 3 个亚组:(D)压缩空气轻吹牙面 20 s 使之干燥;(W)牙本质面保持润湿状态;(RW)压缩空气轻吹牙面 20 s 后,用占有蒸馏水的棉签重新润湿牙面 20 s。然后,所有样本在 2.5 %的戊二醛溶液(pH 5.8)中固定 6 h,磷酸盐缓冲液(PBS)彻底冲洗,酒精梯度脱水,干燥,喷金后场发射扫描电镜(FESEM,S-4800,Hitachi,Tokyo,Japan)观察牙本质的微观形貌。

1.2 牙本质表面水合性能的评估

10 颗新鲜拔除的无龋坏人磨牙,在流水降温下,慢速切割机切取 5 mm 厚的冠中部牙本质片,每个牙本质片再平均分为 9 个小块(约 3×3×5 mm³),水砂纸打磨冠方牙面至 1200 目,

超声清洗备用。

所有牙本质块随机分为 9 组(n=10),按 1.1 中所示步骤进行酸蚀、酶孵育、表面处理及固定。每个样本除了冠方处理面,其余 5 个面均涂布两层速干指甲油,然后浸泡入 0.1 %的罗丹明 B 溶液(Merck,Darmstadt,Germany)中染色 24 h^[16],环氧树脂包埋,硬组织切片机(SP1600,Leica,Germany)垂直于冠方牙本质切片(厚约 100μm),激光共聚焦扫描电镜(CLSM;FV1000,Olympus,Japan)观察染色部分的厚度,即脱矿牙本质层的厚度。在标准的对比度、亮度和激光强度下拍摄各组图片,利用 FV10-ASW 3.1 Viewer(Olympus)分析软件测量其染色区域的厚度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对脱矿牙本质厚度进行双因素方差分析,检验酶处理、表面润湿度及两因素的交互作用对脱矿牙本质厚度的影响,组间分析利用 LSD-t 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 牙本质胶原纤维的形态学分析

各组牙本质胶原纤维的微观形貌如图 1 所示。对照组牙本质在干燥状态下胶原纤维塌陷(1a),在湿润状态下胶原纤维网状结构蓬松,纤维间存在一定间距(1b),重润湿可使塌陷的胶原纤维部分恢复蓬松状态(1c);C-ABC 组牙本质在干燥状态下胶原网状结构塌陷(1d),润湿状态时胶原网与对照组正常状态下形态相似,但纤维间距较大(1e),重润湿可以部分恢复胶原形貌(1f);TRY 组中,同样可观察到增大的胶原纤维间距现象发生(1g-1i),重润湿并不能将胶原纤维恢复到润湿状态的形貌(1i)。

2.2 牙本质表面水合性能的评估

脱矿的胶原基质厚度与牙本质水合性能间存在着一定的相关关系。水合性能增强时,脱矿牙本质层的厚度也会相应增大。CLSM 观察到的各组脱矿牙本质的厚度变化如图 2 所示。表 1 中显示的是 FV10-ASW 3.1 Viewer 软件测量的各组厚度值,双因素方差分析结果表明酶处理、牙本质表面润湿性及两因素的交互作用均对脱矿胶原基质的厚度有显著影响(p<0.0001)。对照组润湿状态下脱矿牙本质厚度值最大(29.60±1.58 μm),TRY 组干燥状态下厚度值最小(7.40±0.97 μm)。

3 讨论

非胶原细胞外基质蛋白在硬组织的形成和矿化中发挥着重要作用^[9]。免疫组化染色、胶体金标记、超微结构观察等技术均证实牙本质中存在 PGs^[4]。Bertassoni^[5]等认为 PGs 与牙本质胶原纤维形成的超分子网状结构将胶原纤维连接在一起。去除 GAG 可能会导致胶原纤维三维结构的部分丧失^[17]。本实验旨在使用两种酶分别去除牙本质中的 PGs 和 GAGs,评价两者在维持胶原纤维形貌和脱矿牙本质水合性能方面发挥的作用。C-ABC 酶和 TRY 酶孵育牙本质后,胶原纤维的空间结构发生变化,纤维间距增大,因此 GAG 侧链是维持牙本质空间结构的重要分子,PGs 核心蛋白可能在调节胶原纤维结构方面也有一定的作用,但还需进一步的试验证实。

本实验通过罗丹明 B 染色和 CLSM 相结合的方法评价脱

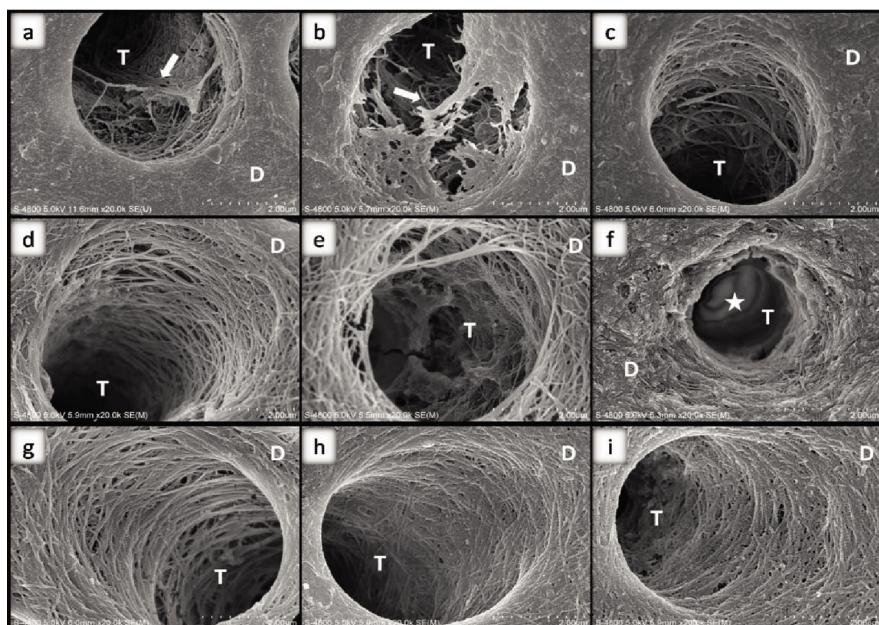


图1 各组牙本质表面微观形貌的场发射扫描电镜观察

Fig.1 Representative scanning electron micrographs of the dentin surface morphology in the control/C-ABC/TRY groups

注:D 牙本质;T 牙本质小管; a 对照组 / 干燥; b 对照组 / 湿润; c 对照组 / 重润湿; d C-ABC 组 / 干燥; e C-ABC 组 / 湿润; f C-ABC 组 / 重润湿; g TRY 组 / 干燥; h TRY 组 / 湿润; i TRY 组 / 重润湿

Note: D dentin; T dentin tubule; a control/dry; b control/wet; c control/rewet; d C-ABC/dry; e C-ABC/wet; f C-ABC/rewet; g TRY/dry; h TRY/wet; i TRY/rewet

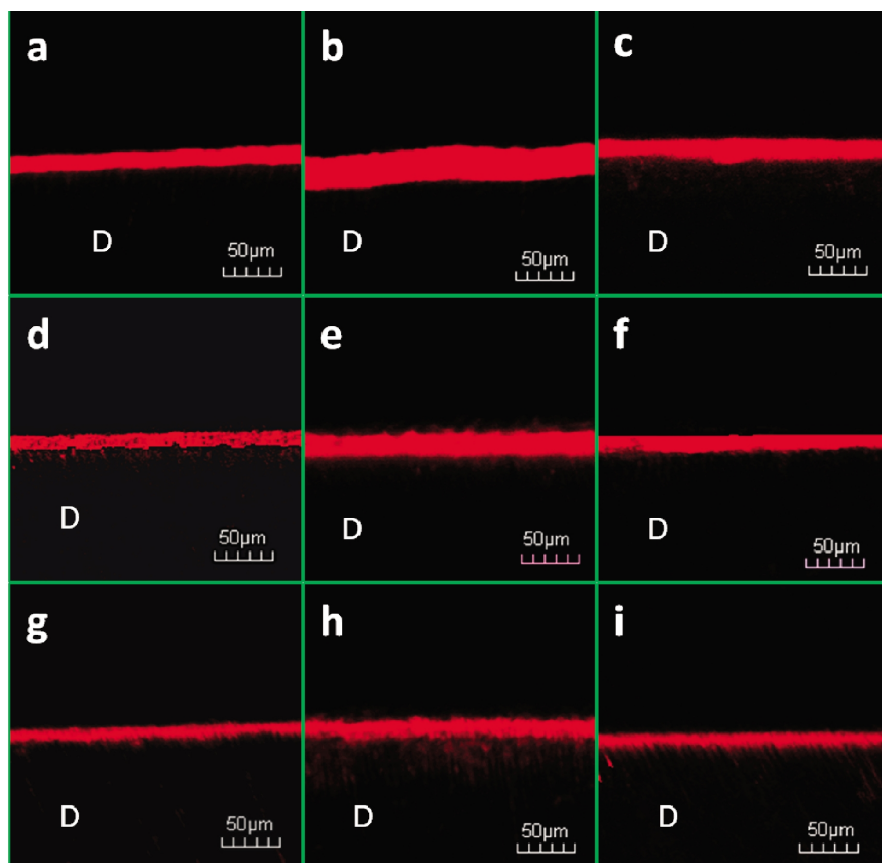


图2 各组脱矿牙本质纵剖面激光共聚焦扫描电镜图片

Fig.2 CLSM images of the longitudinal sections of specimens that were treated with different enzymes under different dentin hydration conditions to examine the thickness of acid-etching dentin

注: a.对照组 / 干燥; b.对照组 / 湿润; c.对照组 / 重润湿; d.C-ABC 组 / 干燥; e.C-ABC 组 / 湿润; f.C-ABC 组 / 重润湿; g.TRY 组 / 干燥; h.TRY 组 / 湿润; i.TRY 组 / 重润湿; D.牙本质

Note: a.control/dry; b.control/wet; c.control/rewet; d.C-ABC/dry; e.C-ABC/wet; f.C-ABC/rewet; g.TRY/dry; h.TRY/wet; i.TRY/rewet; D.dentin.

表 1 各组脱矿牙本质的厚度($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)($n=20$)Table 1 Mean acid-etching dentin thicknesses ($\pm$ standard deviations) in μm ($n=20$)

enzyme treatment	Dry	Wet	Rewet
Control group	14.20 $\pm$ 2.20	29.60 $\pm$ 1.58	18.40 $\pm$ 1.58
C-ABC group	12.60 $\pm$ 0.97	19.00 $\pm$ 1.05 ^a	15.20 $\pm$ 1.40 ^a
TRY group	7.40 $\pm$ 0.97 ^a	15.20 $\pm$ 1.69 ^a	9.40 $\pm$ 1.35 ^a

Note: a $p < 0.05$ vs Control group under the same condition.

矿牙本质胶原基质的厚度。GAG 侧链通过 PG 核心蛋白与牙本质基质中的胶原纤维密切相连, GAG-GAG 分子间存在多种静电斥力, 包括相邻 GAG 分子间、相对 GAG 分子间、交错结合的 GAG 分子间以及空间位阻的相对 GAG 分子间^[18]。这些固有的分子间作用力维持了细胞外基质的生物力学性能和扩展性^[19]。在本实验中, 脱矿牙本质表面润湿状态下, 亲水性的 GAG 侧链吸引水分子并存在静电斥力作用, 使胶原-PG 网状结构呈蓬松状态, 维持脱矿牙本质层的厚度。相反地, 在 C-ABC 和 TRY 组中, PG 和 GAG 分子被去除, 同时静电斥力作用消失, 因此脱矿牙本质的厚度无法维持正常水平。

脱矿牙本质在干燥状态下塌陷, 这是由于水分蒸发后, 胶原纤维间隙内的基质成分浓度增大^[20], PGs 的体积也缩小为原来的五分之一, GAG 侧链上携带的带电基团相互靠近, 使得胶原纤维间氢键也增多^[21], 造成牙本质基质的崩塌或皱缩。在润湿状态下, 这些聚集在一起的分子被水溶解扩散, 胶原纤维便恢复蓬松状态。但是, 当 GAG 侧链或 PG 被去除后, 胶原纤维间的静电氢键结合力消失, 纤维间距不能再恢复正常水平。

综上所述, 本实验中使用 C-ABC 和 TRY 处理脱矿牙本质可改变其微观形貌和水合性能, 提示牙本质非胶原蛋白有可能在粘接树脂在脱矿牙本质中的渗入方面发挥重要作用, 但仍需要进一步的实验验证, 同时, 以后的实验也应在纳米分子水平对 PG-GAG 复合体在粘接过程中发挥的作用进行更深入的探讨。

参考文献(References)

- [1] Okolicsanyi R K, Griffiths L R, Haupt L M. Mesenchymal stem cells, neural lineage potential, heparan sulfate proteoglycans and the matrix [J]. *Dev Biol*, 2014, 388(1): 1-10
- [2] Deshpande A S, Fang P A, Zhang X, et al. Primary structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(8): 2933-2945
- [3] Cao Y, Liu W, Ning T, et al. A novel oligopeptide simulating dentine matrix protein 1 for biomimetic mineralization of dentine [J]. *Clin Oral Invest*, 2014, 18(3): 873-881
- [4] Goldberg M, Kulkarni A B, Young M, et al. Dentin: structure, composition and mineralization [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3(1): 711-735
- [5] Bertassoni L E, Orgel J P, Antipova O, et al. The dentin organic matrix-limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(7): 2419-2433
- [6] Bella J, Hindle K L, McEwan P A, et al. The leucine-rich repeat structure [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(15): 2307-2333
- [7] Orgel J P, Eid A, Antipova O, et al. Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding [J]. *PLOS ONE*, 2009, 4(9): e7028
- [8] Zhu Q, Sun Y, Prasad M, et al. Glycosaminoglycan chain of dentin sialoprotein proteoglycan [J]. *J Dent Res*, 2010, 89(8): 808-812
- [9] Haruyama N, Sreenath T L, Suzuki S, et al. Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization [J]. *Matrix Biol*, 2009, 28(3): 129-136
- [10] Goldberg M, Septier D, Rapoport O, et al. Biglycan is a repressor of amelogenin expression and enamel formation: an emerging hypothesis [J]. *J Dent Res*, 2002, 81(8): 520-524
- [11] Septier D, Hall R C, Embery G, et al. Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor [J]. *Calcif Tissue Int*, 2001, 69(1): 38-45
- [12] Milan A M, Sugars R V, Embery G, et al. Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans [J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(2): 127-135
- [13] Bertassoni L E, Marshall G W. Papain-gel degrades intact nonmineralized type I collagen fibrils [J]. *Scanning*, 2009, 31(6): 253-258
- [14] Bartold P M, Miki Y, Mcallister B, et al. Glycosaminoglycans of human cementum [J]. *J. Periodontal Res.*, 1988, 23(1): 13-17
- [15] Ding P G, Matzer A R, Wolff D, et al. Relationship between microtensile bond strength and submicron hiatus at the composite-dentin interface using CLSM visualization technique [J]. *Dent Mater*, 2010, 26(3): 257-263
- [16] Parfitt G J, Pinali C, Young R D, et al. Three-dimensional reconstruction of collagen-proteoglycan interactions in the mouse corneal stroma by electron tomography [J]. *J Struct Biol*, 2010, 170(2): 392-397
- [17] Seog J, Dean D, Plaas A H K, et al. Direct measurement of glycosaminoglycan interactions via high-resolution force spectroscopy [J]. *Macromolecules*, 2002, 35(14): 5601-5615
- [18] Bedran-Russo A K, Castellan C S, Shinohara M S, et al. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(4): 1735-1741
- [19] Nakabayashi N, Watanabe A, Igarashi K. AFM observation of collapse and expansion of phosphoric acid-demineralized dentin [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 68(3): 558-565
- [20] Marshall S P H, M R. The cementum-dentin junction also contains glycosaminoglycans and collagen fibrils [J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 151(1): 69-78